

# 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 湯本 健太郎

横浜市立大学大学院医学研究科 呼吸器病学

## 審 査 員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科	微生物学	教授	梁	明秀
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	病態病理学	准教授	奥寺	康司
副査	横浜市立大学附属市民総合医療センター	感染制御部	講師	築地	淳

Nasally Administered *Lactococcus lactis* Secreting  
Heme Oxygenase-1 Attenuates Murine Emphysema

(へムオキシゲナーゼ-1 分泌 *Lactococcus lactis* の経気道的投与による  
マウス気腫形成抑制効果の検証)

慢性閉塞性肺疾患 (Chronic obstructive pulmonary disease ; COPD) は、たばこ煙を代表とする毒性物質の長期間にわたる吸入曝露が起因となる炎症性肺疾患で、肺気腫は COPD における病型の一つである。COPD は世界での死亡原因の第 3 位を占めているが、基本的には根治となる治療法が存在せず、予防のためには病因となる酸化ストレスや炎症性メディエーターへの曝露を避けるために禁煙などの原因物質の吸入曝露を回避することが必要となる。へムオキシゲナーゼ-1 (Heme oxygenase-1 ; HO-1) は抗炎症・抗酸化作用などにより酸化ストレスや炎症からの組織障害に対する防御機構に関連していると考えられており、COPD 発症メカニズムとの関連も示唆されている。本研究では肺への HO-1 到達を目的に遺伝子組換え乳酸菌を使用した治療方法を開発した。COPD 動物モデルとしてエラスターゼ誘導性肺気腫モデルマウスに対する、HO-1 を分泌する遺伝子組換え *Lactococcus lactis* (HO-1 *lactis*) の経気道的な投与による安全性と治療効果を検証した。

HO-1 *lactis* 経鼻投与により、肺内での外因性の HO-1 の発現が認められ、さらに血清中の HO-1 値上昇も認められた。また、生理学的・形態学的に肺気腫進行の抑制が認められた。投与後 48 時間に最大となる体重減少を認めたが、生存率や最終的な体重に影響は与えなかった。遺伝子組換え *Lactococcus lactis* の (genetically modified *Lactococcus lactis* ; gm-*L.lactis*) 経気道投与による HO-1 投与は、安全で有効な COPD の治療方法である可能性が示唆された。

審査にあたり以上の研究報告がなされた後、以下の質疑応答が行われた。

まず、築地副査から以下の論評と質問がなされた。

- 1) HO-1 *lactis* の経鼻投与の血清 HO-1 上昇にあたり、乳酸菌の経気道感染による菌血症による結果なのか、それとも HO-1 *lactis* による HO-1 の肺内発現が全身循環に波及したものなのか。菌血症であれば治療対象となり安全性が懸念される。血液検査などによる菌血症のさらなる否定の検証が必要であると考えられる。また、経鼻投与による全身循環への波及は全身性の炎症性疾患への治療応用が期待されるが、その機序の説明が必要である。
- 2) 気管支肺胞洗浄液(BALF)中の HO-1 の定量測定は行ったか。血清中の HO-1 との比較は行ったか。
- 3) HO-1 *lactis* の経腸投与による効果はみられるのか。

これらの論評と質問に対して、以下の回答を得た。

- 1) HO-1 *lactis* 投与後に一時的な体重減少を認めたが最終体重として有意な減少は認めておらず、また HO-1 を発現しない gm-*L.lactis*(Control *lactis*)での血清 HO-1 の高発現も認めておらず、菌血症によ

るものとは考えていない。ただ、感染症の否定は安全性の証明につながるため、血液検査を含めた菌血症の否定に向けたさらなる検証を今後検討していきたい。また、全身循環への波及の機序についても今後さらなる解明を行っていきたい。

- 2) BALF 中のケモカインやサイトカインの測定は行ったが、HO-1 の定量測定は行っておらず、HO-1 lactis の経鼻投与による全身循環への波及の機序解明の一環として測定を予定したい。
- 3) 本研究では、局所投与としての吸入療法の開発に向けた気道投与での安全性と効果を検証した。治療応用に向けて経腸投与との比較も検証していきたい。

次に、奥寺副査から以下の論評と質問がなされた。

- 1) 乳酸菌の経鼻投与のアイデアに至った経緯はどういうものか。
- 2) HO-1 を直接投与することと比べて、乳酸菌を用いて投与するメリットは何か。
- 3) 病理組織では肺胞内のマクロファージやⅡ型気道上皮細胞で HO-1 が発現しているが、内因性のものではないか。細菌に対する反応としての肺炎は起こらないのか。HO-1 の発現と吸収過程はどのような機序を想定しているか。
- 4) ヒト臨床への応用の可能性についてはどう考えているか。

これらの論評と質問に対して、以下の回答を得た

- 1) 乳酸菌では異種タンパク質の発現とその運搬体としての開発が行われており、腸疾患に対する経腸投与での治療応用がヒトを対象とした臨床研究もおこなわれている。呼吸器疾患における局所療法として、吸入療法の利点が多く挙げられており、本研究でも COPD に対する吸入療法の開発を目指している。経気道投与として乳酸菌の経鼻投与は、呼吸器疾患モデルマウスなどでの治療応用が報告されてきている。本研究では、炎症性腸疾患に対する治療効果が示唆された HO-1 発現遺伝子組換え *Lactococcus lactis* を、COPD の動物モデルとして肺気腫モデルマウスに経気道投与を行うことによる治療効果の検証を行った。
- 2) 吸入療法における課題の一つが治療物質の末梢気道までの運搬である。病態の首座である末梢気道までの到達に向けた粒子化の必要がある。異種タンパク質を発現する乳酸菌については、乳酸菌が局所に到達し、そこで自律的にタンパク質を産生することで、目的タンパク質の産生体であるとともに運搬体としても期待ができると考え、本研究ではそれが示唆されたと考えている。
- 3) 組織における免疫染色では、主に気道上皮細胞やマクロファージで HO-1 の発現が見られ、さらに抗 His tag 抗体でも染色が見られたため、内因性の HO-1 だけでなく外因性の HO-1 が発現していると考えた。肺炎に関しては投与量が多いと好中球浸潤など炎症所見が見られた。HO-1 の発現過程としては、乳酸菌が末梢気道まで到達し、その場で分泌された HO-1 が気道上皮などに吸収され、乳酸菌自体はマクロファージなどに貪食され排出され则认为しているが、全身循環への波及機序を含めてさらなる HO-1 発現機序の検証を行っていきたいと考えている。
- 4) 食品グレードの安全性を持つ微生物であるが、微生物の経気道投与としてだけでなく、遺伝子組換え微生物に対する安全性の懸念も存在すると考える。安全性の検証をさらに積み重ねていきたいと考えている。また、本研究での乳酸菌の産生する HO-1 の治療効果が示唆されたことにより、経済的に優れる乳酸菌を利用して産生された HO-1 を粒子化して吸入療法に利用する方法も考えている。

続いて、梁主査から以下の論評と質問がなされた。

- 1) 乳酸菌が実際に肺胞に到達している検証はしているのか。時間によってフェーズが異なると思うが、その過程が分かりにくい。アデノウイルスベクターを用いた検証では、実際に感染して遺伝子を導入しているので分かるが、乳酸菌内にある遺伝子からどのようにタンパク質が分泌されているのかその過程をもう少し説明してほしい。現象論での説明だけでなく、血清中での HO-1 の発現など、HO-1 の発現と分泌、吸収の過程などのメカニズムの解明が安全性の説明につながると思われる。
- 2) 本研究のリミテーションは何か。他の DDS の方法と比較した場合の問題点は何か。
- 3) 菌の定着はないのか。炎症を伴わずに排除されるのはどういう機序か。菌自体が死滅するのか。

これらの論評と質問に対して、以下の回答を得た

- 1) GFP 発現遺伝子組換え乳酸菌の投与後の経時的分布の解析で、投与 48 時間後にかけて末梢に分布し、その後 96 時間かけて肺外に排出されていく過程を確認している。また、末梢気道に到達した乳酸菌が HO-1 を分泌していることを BALF 中の HO-1 定量など、説明可能な方法を含めて検討していきたい。
- 2) COPD の動物モデルとしてのエラストアーゼ誘導肺気腫モデルマウスでは、肺気腫だけでなく肺高血圧などヒトの COPD における生理的な変化と異なる点があり、タバコ煙誘導性肺気腫モデルでの検証も今後検討していきたいと考えている。また、DDS としての乳酸菌を利用した治療法には、細菌による気道感染という安全性の懸念が存在することがあり、その点での安全性の十分な検証が必要と考える。乳酸菌の投与による HO-1 の発現・分泌・吸収メカニズムのさらなる解明を行っていきたい。
- 3) 先行研究での報告を含めて、本研究でも 96 時間以降の乳酸菌の気道内への定着はないと考えている。マクロファージに貪食されて肺外に排出される他に、気道内の炎症により死滅することも考えられるが、過程のさらに詳しい検証を検討していきたい。

さらに、奥寺副査から次の論評がなされた。

乳酸菌の投与後の体内での動態の検証、例えば GFP 発現乳酸菌投与後、組織切片上での乳酸菌周囲での反応の検証など、乳酸菌を経気道投与することによる有害な反応を詳細に検証することが安全性の検証につながるのではないか。また、もともと腸管内に常在している細菌であれば、経腸投与によっても効果が得られるのであれば、そちらの方が安全性は高いのではないかと考えられるので、その比較も必要ではないかと考える。

最後に、築地副査から次の論評がなされた。

BALF 中への HO-1 の分泌の検証は必要であるとする。また HO-1 はもともと単球系の細胞で強く発現されるので、外因性の HO-1 を導入する方法と、内因性の HO-1 を誘導する方法との比較の検証も必要であるとする。

以上のような質疑応答がなされた。本学位論文は、肺内へのタンパク質運搬ツールとしての遺伝子組換え乳酸菌の経気道投与の可能性を示した報告である。一方、細菌による気道感染リスクがあり、安全性が

懸念されるため、実用化に向けて、投与後の乳酸菌の動態や安全性の検証が必須であると考えられる。申請者は本学位論文の内容を中心に幅広い質問に的確に答え、この課題について一定の理解と洞察を持っていることを示した。以上より申請者は医学博士を授与されるにあたり相当であると判定した。